

Congelamento

- Banche di cellule per preservare le nostre cellule sia da contaminazioni che dall'invecchiamento della coltura.
- Modo di avere stock allo stesso passaggio.
- Le cellule si conservano a -196°C o per pochi mesi a -80°C .

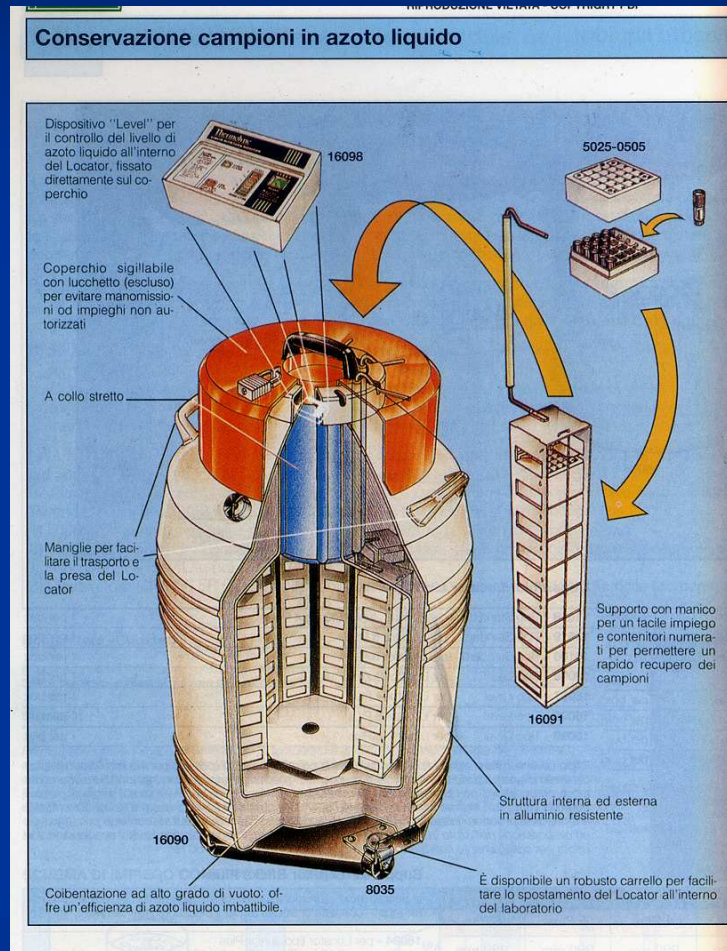
I crioprotettivi

- Il congelamento deve essere fatto in modo da non danneggiare la cellula. Per questo si deve formare nella cellula del ghiaccio amorfo, non cristallino, che può rompere la membrana.
- Per fare questo si deve aumentare la quantità di proteine all'interno della cellula e questo si ottiene con DMSO e un'alta concentrazione di siero, e un congelamento lento.

Procedura:

- Contare le cellule
- Centrifugarle a 250 g x 10 min
- Eliminare il sopranatante e risospendere in terreno contenente 10% DMSO e 50 % FCS, alla concentrazione raccomandata per ogni linea cellulare, di solito tra 0,8 e 3 milioni di cell/mL.
- Mettere in fialine da congelamento (cryovials) da 2 mL
- Congelare lentamente (1 °C al minuto)

- Le cellule vengono conservate in dewar di azoto liquido.



Scongelamento

- Le cellule vanno scongelate rapidamente immergendole in un bagno a 37 °C.
- Dato che il DMSO può essere un agente differenziante, è bene eliminarlo dal terreno di coltura, diluendo il contenuto dei cryovials con circa 20 mL di terreno, o PBS: è importante diluire lentamente, perché c'è una grossa differenza nella pressione osmotica (oncotica) del terreno al 50% di siero e quello al 10 %.

Procedura di scongelamento.

- Scongellare le cellule.
- Trasferirle in una Falcon da 15 mL sterile, aggiungere lentamente 10 mL di terreno, risospendere delicatamente.
- Centrifugare a 250 g x 10 min
- Eliminare il sopranatante e risospendere in terreno, in alcuni casi al 20 % di FCS.